Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 743-753

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر - دی 1397، ص. 753-743

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدهای جنتیسیک و آلفا-رزورسیلیک در محیط‌های روغنی و امولسیون‌های روغن در آب آنها

آزاده مردانی قهفرخی[1]- رضا فرهوش[2*]- علی شریف[3]

تاریخ دریافت: 1396/04/27
تاریخ پذیرش: 1397/04/16

چکیده

فعالیت آنتی‌رادیکالی و آنتی‌اکسیدانی اسیدهای جنتیسیک و آلفا-رزورسیلیک اسید در محیطهای مختلف: حلال متانول، روغن‌های تخلیص شده سویا و زیتون، و امولسیون‌های روغن در آب آنها مورد بررسی قرارگرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات با ساختمان مولکولی آنها ارتباط نزدیکی داشت. اسید جنتیسیک به دلیل قرار داشتن یکی از گروههای عاملی هیدروکسیل در موقعیت اورتو حلقه فنلی‌اش، فعالیت آنتی‌رادیکالی و آنتی‌اکسیدانی بسیار بالاتری نسبت به اسید آلفا-رزورسیلیک (که هر دو گروه عاملی هیدروکسیلی در موقعیت متای حلقه فنلی قرار گرفته است)، در هر سه محیط مورد آزمایش، از خود نشان داد. همچنین ساختار آبدوست‌تر اسید جنتیسیک موجب گردید این ترکیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در روغن‌های زیتون و سویا، نسبت به امولسیون‌های روغن در آب آنها نشان دهد، در حالی که آلفا-رزورسیلیک به دلیل دارا بودن ساختار آبگریزتر، در امولسیون‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به روغن داشت. محیط متانولی استفاده شده به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌رادیکالی DPPH اسید جنتیسیک و آلفارزورسیلیک، به دلیل برقراری پیوند هیدروژنی با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد آزمایش، موجب کاهش چشمگیر در فعالیت آنتی‌رادیکالی این ترکیبات گردید.

واژه‌های کلیدی: اسید جنتیسیک، اسید آلفا-رزورسیلیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روغن‌های گیاهی، امولسیون

مقدمه

ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که به شکل وسیعی در طبیعت توزیع گشته‌اند، به‌طوری که تا به حال حدود هشت هزار ترکیب فنلی در بخش‌های مختلف گیاهان شناسایی شده است (Herrmann, 1989). فنل‌ها به‌طور گسترده در صنایع مختلف از قبیل تولید رنگ، دارو، آنتی‌اکسیدان‌ها، حشره‌کش‌ها، طعم‌دهنده‌ها و مواد معطر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Verpoorte *et al*., 2002). ترکیبات مختلفی از جمله اسیدهای فنولی، تانن‌ها، فلاونوئیدها و کومارین‌ها در زمره ترکیبات فنلی قرار دارند. این ترکیبات از نظر فعالیتهای بیولوژیکی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی و ضدسرطانی همواره مورد توجه بوده‌اند (Middleton *et al*., 2000).

اسیدهای هیدروبنزوئیک، شاخه مهمی از اسیدهای فنولی می‌باشند که با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی قادر به ایفای نقش مهمی در جلوگیری از اکسایش مواد غذایی و حفظ سلامتی می‌باشند. فرایند اکسایش چربی‌ها و روغن‌ها با تخریب اسیدهای چرب ضروری و تولید ترکیبات مخرب اکسایشی موجب از بین بردن خواص تغذیه‌ای و چشایی مواد غذایی گشته و اثرات مخربی بر سلامت افراد می‌گذارد (Marinova & Yanishlieva, 2003).

از منظر ساختار شیمیایی تمامی اسیدهای هیدروبنزوئیک از نظر وجود حلقه فنولی و دست کم یک گروه کربوکسیل در ساختمان مولکولی شباهت دارند و تنها تفاوت آنها از نظر تعداد و موقعیت گروه‌های عاملی همچون هیدروکسی، متوکسی و آلکیل استر است (Biskup *et al*., 2013). وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختمان اسیدهای هیدروبنزوئیک، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری در مقایسه با سایر گروههای عاملی به این ترکیبات می‌دهند (Farhoosh *et al*., 2016). ثابت شده افزایش تعداد گروههای هیدروکسیل و قرارگیری این گروهها در موقعیت اورتو و پارای حلقه فنلی، نقش کلیدی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات ایفا می‌کند (Cheng *et al*., 2003).

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: rfarhoosh@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v14i5.66201

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای هیدروبنزوئیک تابع توانایی انتقال هیدروژن یا الکترون از این ترکیبات به رادیکال‌های آزاد می‌باشد. افزایش تعداد مولکولهای هیدروژن و کاهش انرژی پیوند این هیدروژنها موجب انتقال هرچه بیشتر و ساده تر آنها به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه خنثی‌سازی این رادیکال‌ها می‌گردد. هیدروژن گروههای هیدروکسیل قرار گرفته در مجاورت گروه اسیدی کربوکسیلی حلقه فنلی (موقعیت اورتو) به‌دلیل قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی درون مولکولی با این گروه اسیدی، آنتالپی تفکیک پیوندی پایینتری نسبت به هیدروژن‌های قرار گرفته در موقعیت‌های دورتر از گروه اسیدی کربوکسیلی (متا) پیدا کرده، با سهولت بیشتری از آنتی‌اکسیدان جدا و به رادیکال آزاد منتقل می‌گردد (Farhoosh *et al.*, 2016).

علاوه بر ویژگی‌های ساختمانی آنتی‌اکسیدان‌ها، ثابت دی‌الکتریک و قدرت یونی محیط به‌کار گرفته شده به‌منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تاثیر بسزایی بر میزان فعالیت آنها دارد. بالا بودن تمایل محیط در برقراری پیوند هیدروژنی بین مولکولی با آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی آنتی‌اکسیدان و به تبع آن کاهش فعالیت آنتی‌رادیکالی این ترکیبات می‌گردد (Shahidi, 2015). از این رو استفاده از محیط‌های متفاوت، کمک شایانی در درک بهتر مکانیسم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات خواهد کرد.

اسید جنتیسیک (3و 5- دی هیدروبنزوئیک اسید) و اسید آلفارزورسیلیک (2و 5- دی هیدروبنزوئیک اسید)، ترکیبات اسید دی‌هیدروبنزوئیکی هستند که به‌طور گسترده در منابع گیاهی از جمله درخت کاکائو، چغندر قند، تمشک، آواکادو، غلات، گردو و حتی صمغ عربی شناسایی شده‌اند (Billaud *et al*., 1996; Shahidi *et al*., 2003; Griffiths, 1959; Sakas *et a*l., 2004). این ترکیبات علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات سلامتی بخشی چون خصوصیات ضدسرطانی، ضدتومور، ضدالتهابی و قابلیت پیشگیری از ابتلا به بیماریهای قلبی را نیز دارا می‌باشند (Ashidate *et al*., 2005).

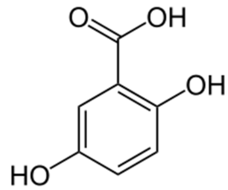
از آنجایی که کارایی و درجه تاثیرگذاری آنتی‌اکسیدان‌ها به سهولت جدا شدن اتم هیدروژن از آنها مربوط می‌شود، وجود حلقه بنزن و دو گروه هیدروکسیل در ساختمان اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک ممکن است خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مناسبی به این ترکیبات ببخشد (Shahidi & Wanasundara, 1992). به‌طوری که در پژوهشی که Réblová (2012) به‌منظور بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدانها بر فرایند اکسایش چربی‌های خوراکی در دماهای مختلف انجام دادند، اسید جنتیسک قادر به افزایش چشمگیری در پایداری اکسایشی چربی خوک حتی تا دمای 150 درجه سانتی‌گراد گردید. همچنین در پژوهشی که Perez-Gonzalez در خصوص مطالعه تاثیر تفاوتهای ساختاری بر مکانیسم اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدهای دی هیدروبنزوئیک در محیطهای قطبی و محلول‌های آبی به انجام رسانید، اسید جنتسیک به‌عنوان یکی از موثرترین آنتی‌رادیکال‌ها در بین اسیدهای دی‌هیدروبنزوئیک مورد آزمون شناخته شد. این در حالی است که اسید آلفارزورسیلیک با فرمول شیمیایی مشابه اسید جنتیسیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایینی نشان داده است (Perez-Gonzalez *et al*., 2014). نتایج مشابهی نیز در پژوهشی که Biskup و همکارانش (2013) که به‌منظور برآورد فعایت آنتی‌اکسیدانی برخی ترکیبات فنلی توسط روش‌های ABTS (Absorbance of (2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-suslfonic acid) و FRAP (The ferric reducing antioxidant power) انجام گرفت، گزارش گردیده است. در این پژوهش‌ها علت تفاوت فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک به تفاوت ساختاری آنها نسبت داده شده است، مشترک بودن یک گروه هیدروکسیل در موقعیت 5 حلقه بنزن و قرارگیری گروه هیدروکسیل دیگر در موقعیت اورتو ساختمان اسیدهای جنتیسیک و متای آلفارزورسیلیک (شکل 1) عامل مهم تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها می باشد. البته در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات حتما باید ویژگی‌های محیط و تاثیراتی که محیط مورد استفاده بر گروههای عاملی آنتی‌اکسیدان‌ها و پیوندهای بین مولکولی و درون مولکولی آنها می‌گذارد را نیز مد نظر قرار داد. در واقع، آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط‌های مختلف، رفتارهای متفاوتی از خود بروز می‌دهند (Shahidi *et al*., 2015).

از این‌رو در این پژوهش تاثیر ویژگی‌های ساختمانی اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات، تحت تاثیر محیط‌های مختلف آزمون: متانولی، لیپیدی با درجه اشباعیت متفاوت و امولسیونی مورد مطالعه قرار گرفته است. اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک شباهت ساختاری بالایی داشته و تنها از نظر موقعیت قرارگیری یکی از گروههای عاملی هیدروکسیل در حلقه بنزنی متفاوت هستند. این تفاوت ساختمانی بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات و قرارگیری آنها در مکان رخ دادن فرایند اکسایش یعنی سطح مشترک روغن- هوا در سیستم لیپیدی و سطح مشترک روغن- آب در سیستم امولسیونی تاثیر به‌سزایی خواهد داشت.

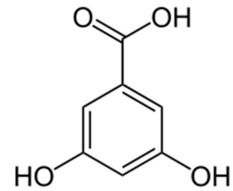
مواد و روش‌ها

روغن‌های زیتون و سویای تصفیه، رنگبری و بوگیری شده فاقد آنتی‌اکسیدان افزوده شده، به‌ترتیب از واحدهای صنعتی اتکا و سه گل نیشابور خریداری و تا زمان آزمون در دمای $-4°C$ در تاریکی نگه‌داری شد. ترکیب اسیدهای چرب این روغن‌ها در جدول 1 نشان

داده شده است. اسیدهای آلفارزورسیلیک و جنتیسیک از شرکت مرک آلمان و سایر مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک و سیگما تهیه شدند



(a)



(b)

شکل 1- ساختمان مولکولی اسید جنتیسیک (a) و اسید آلفارزورسیلیک (b).

جدول 1- ترکیب اسیدهای چرب نمونه‌های روغن

اسید چرب	نام اختصاری	روغن سویا (٪)	روغن زیتون (٪)
اسید پالمیتیک	C16:0	11/66 ± 0/1	11/12 ± 0/27
اسید پالمیتولئیک	C16:1	0/81 ± 0/16	1/31 ± 0/2
اسید استئاریک	C18:0	4/62 ± 0/23	4/2 ± 0/07
اسید اولئیک	C18:1	22/08 ± 0/01	68/4 ± 0/17
اسید لینولئیک	C18:2	51/4 ± 0/05	8/67 ± 0/17
اسید لینولنیک	C18:3	7/92 ± 0/19	0/62 ± 0/05
نسبت اسیدهای چرب چند غیر اشباع به اسیدهای چرب اشباع	PUFA/SFA	3/33 ± 0/06	0/48 ± 0/02
نسبت اسیدهای چرب تک غیر اشباع به چند غیر اشباع	MUFA/PUFA	0/78 ± 0/2	7/99 ± 0/11
شاخص اکسایش‌پذیری روغن	COX Value[a]	7/24 ± 0/15	1/75 ± 0/03

[a]شاخص اکسایش‌پذیری روغن = [1(C18:1%) + 10.3(C18:2%) + 21.6(C18:3%)] / 100

تخلیص روغن‌ها

به‌منظور حذف توکوفرول و آنتی‌اکسیدانهای طبیعی موجود در روغن‌ها، از روش کروموتوگرافی استفاد شد (Yanishlieva & Marinova, 1995). 130 گرم روغن از ستون کروماتوگرافی با طول 25 و قطر 2/5 سانتی‌متر، پر شده با 70 گرم اکسید آلمینیوم 60 (فعال، خنثی) و 15 گرم سیلیکاژل عبور داده و توسط مکش و بدون استفاده از حلال جمع‌آوری گردید. برای اطمینان از حذف کامل آنتی‌اکسیدانهای طبیعی، هر روغن دو بار از ستون‌های کروماتوگرافی پرشده تازه عبور داده شد (Yoshida *et al*., 1992). به‌منظور فعال‌سازی مواد جاذب پیش از استفاده، به مدت 3 ساعت در دمای 200 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. اطراف ستون کروماتوگرافی و ارلن بوخنر با ورقه آلمینیومی پوشیده شد تا از اکسایش روغن جلوگیری به عمل آید.

تهیه امولسیون روغن در آب

به‌منظور تهیه فاز آبی امولسیون، 1 گرم توویین 20 در 90 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل و سپس برای اطمینان از حل شدن کامل توویین در آب، به مدت 12 ساعت در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس فاز آبی به مخلوط کن با سرعت بالا (Waring Commercial, USA) منتقل شد و 10 گرم روغن حاوی 200 پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان، قطره قطره به آن اضافه و به مدت 2 دقیقه هم زده شد. امولسیون حاصله توسط دستگاه اولتراتراکس با سرعت 12000 دور در دقیقه، به مدت 3 دقیقه همگن شد. برای پایداری بیشتر، امولسیون در بین تمامی مراحل در حمام یخ نگه‌داری گردید.

اندازه‌گیری ضریب توزیع (Log P)

محلول 0/3 میلی‌مولار از هر آنتی‌اکسیدانی در 1-اکتانول تهیه شد و به مدت یک ساعت در دمای 60 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. طیف UV این محلول گرفته و جذب حداکثر آن گزارش شد(A_o). سپس حجم برابری از محلول بافر استات (pH برابر 5/5 و 3/5، غلظت 0/1 مولار) و محلول نمونه در 1-اکتانال مخلوط شد و 2500 دور در دقیقه ورتکس گردید. پس از سی دقیقه، میزان حداکثر جذب لایه 1-اکتانول در ناحیه فرابنفش قرائت شد (A_x). ضریب توزیع آنتی‌اکسیدان‌ها (P) بر اساس معادله 1 محاسبه گردید (Gordon *et al*., 2001; Lima *et al*., 2006).

$$P = \frac{A_x}{A_o - A_x} \quad (1)$$

آزمون DPPH

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات، از رادیکال آزاد 2و 2- دی فنیل هیدرازیل استفاده شد. از هر آنتی‌اکسیدان غلظت‌های مختلف (بسته به قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد) در متانول تهیه گردید و سپس یک میلی‌لیتر از هر غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها با یک میلی‌لیتر از محلول 0/006 درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول واکنش داده شد (Lima *et al*., 2006). پس از نگه‌داری به مدت 30 دقیقه در مکان تاریک، جذب نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر (A_S) در برابر شاهد (A_C) قرائت شد. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط نمونه‌های مختلف (I%) برحسب معادله (2) محاسبه شد:

$$I\% = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100 \quad (2)$$

پس از رسم نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در غلظت‌های مختلف نمونه، غلظتی از نمونه که 50 درصد رادیکال آزاد را مهار کرد از طریق درون‌یابی به‌عنوان فاکتور IC50 گزارش شد و بر اساس این فاکتور طبق معادله (3) فعالیت آنتی‌رادیکالی (RSA) محاسبه گردید (Brand-Williams *et al*., 1995).

$$RSA = 100 \times (1/IC_{50}) \quad (3)$$

پایش پایداری اکسایشی روغن‌ها

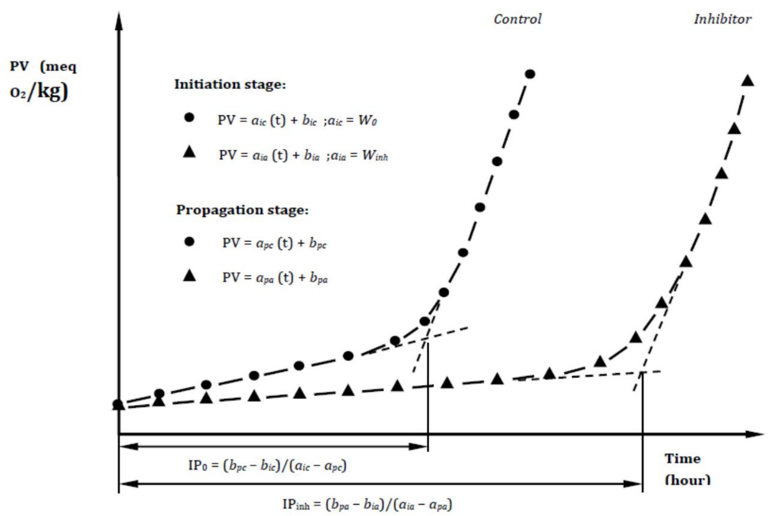
به‌منظور انجام فرایند اکسایش تحت رژیم سینتیکی که در آن اکسیژن عامل محدودکننده نباشد،4 گرم روغن تخلیص شده حاوی 200 پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان به پلیت شیشه ای با قطر 9 سانتی‌متر منتقل شد. فرایند اکسایش در دمای 80 درجه سانتی‌گراد آون، با نمونه‌گیری طی زمان‌های متوالی و اندازه‌گیری عدد پراکسید به روش اسپکتروفتومتری پایش شد (Shantha & Decker, 1994).

کارایی آنتی‌اکسیدان در روغن بر اساس دوره القا اکسایش تخمین زده شد. به‌منظور محاسبه دوره القا اکسایش لیپیدی بر حسب عدد پراکسید، نمودار تغییرات شاخص های مزبور در مقابل زمان ترسیم گردید (شکل 2)، سپس معادلات خطی مرتبط با بخش‌های آغازین و انتشار اکسایش لیپیدی برازش داده شد و آنگاه دوره‌های القا از تلاقی دادن معادلات خطی یاد شده محاسبه گردید (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روغن بر اساس معادله 4 محاسبه شد:

$$A = (IP_{inh} \times W_0) / (IP_0 \times W_{inh}) \quad (4)$$

IP_{inh} دوره القا اکسایش در حضور آنتی‌اکسیدان، IP_0 دوره القا اکسایش در عدم حضور آنتی‌اکسیدان، W_{inh} و W_0 سرعت اکسایش (شیب خطی مرحله آغازین اکسایش لیپیدی) به‌ترتیب در حضور و عدم حضور آنتی‌اکسیدان می‌باشند.



شکل 2- منحنی شماتیک تولید پراکسید طی اکسایش سیستم‌های لیپیدی

پایش پایداری اکسایشی امولسیون‌ها

فرایند اکسایش در امولسیون‌ها به شیوه Lingnert و همکاران (1979)، بر اساس اندازه‌گیری میزان مصرف اکسیژن در امولسیون طی فرایند اکسایش، با استفاده از دستگاه YSI مدل 5300A در دمای 70 درجه سانتی‌گراد ، پایش شد. 3 میلی‌لیتر از هر امولسیون در ظروف مخصوص دستگاه ریخته و با گاز اکسیژن با خلوص بالا اشباع شد. سپس برای تسریع واکنش به هر ظرف 10 میکرولیتر AAPH[1] (100 میلی مولار) تزریق گردید و بلافاصله میزان کاهش فشار

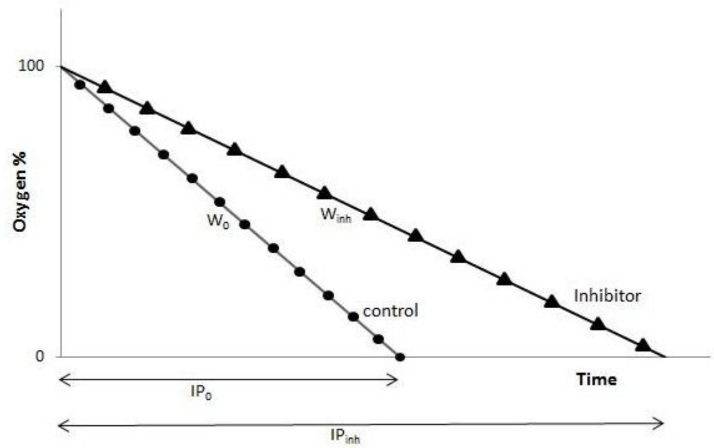
[1] 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

اکسیژن توسط دستگاه اندازه‌گیری شد (شکل 3).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس معادله 5 محاسبه شد:

$$A = (IP_{inh} \times W_0) / (IP_0 \times W_{inh}) \quad (5)$$

IP_{inh} دوره القـا اکسـایش بـر پایـه فشـار اکسـیژن در حضـور آنتی‌اکسیدان، IP_0 دوره القا اکسایش در عدم حضـور آنتـی‌اکسـیدان، W_{inh} و W_0 سـرعت اکسـایش بـه‌ترتیـب در حضـور و عـدم حضـور آنتی‌اکسیدان می‌باشند.



شکل 3- منحنی شماتیک درصد مصرف اکسیژن طی اکسایش سیستم‌های امولسیونی

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام و نتـایج در قالـب طـرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس گردید. میانگین صـفات بـا نـرم‌افـزار آماری SPSS و بر اساس آزمون چنـد دامنـه‌ای دانکـن در سـطح 5 درصد ($P<0/05$) مقایسه شدند .به منظور ترسیم نمودارهای مربوطه از نرم افزار MicrosoftExcel استفاده شد.

نتایج و بحث

ضریب توزیع (Log P)

ضریب توزیع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی براساس میزان توزیع نسبی آنها در آب و1-اکتـانول، بـر مبنـای pKa=4.5 ترکیبـات فنلـی، در pHهای 3/5 و 5/5 اندازه‌گیری شد. مقدار این شـاخص بـه عـواملی چون قطبیت، حلالیت و خصوصیات ساختمانی این ترکیبات بسـتگی دارد، ترکیباتی با قطبیت بیشتر تمایل بیشتری برای ورود به فاز آبی دارند و در نتیجـه ضـریب توضـیع پـایین‌تـری را نشـان مـی‌دهنـد (Schwarz *et al.*, 2000).

همانگونه که در جدول 2 نشان داده شده، در هـر دو pH 3/5 و 5/5، اسـید جنتیسـیک ضـریب توزیـع پـایینتری نسـبت بـه اسـید آلفارزورسیلیک نشان داده است. این تفـاوت نشـان‌دهنـده سـاختمان آبدوست‌تر اسید جنتیسیک نسبت به اسید آلفارزورسیلیک می‌باشد.

در pHهای اسیدی که گروه کربوکسیل ترکیبات فنولی تمایل به پروتونه شدن پیدا می‌کند، وجود گروه‌های کِشنده‌ی الکترونـی ماننـد گروه هیدروکسیل در حلقه آروماتیک، نقش بسزایی در افزایش قطبیت و حلالیت ترکیبات ایفا خواهد کرد.

در سـاختمان مولکـولی اسـید جنتیسـیک، یکـی از دو گـروه هیدروکسیل در موقعیت اورتو حلقه فنلی قرار دارد. این گروه کِشـنده الکترون، از نظر موقعیت مکانی به گروه اسیدی کربوکسیل نزدیکتـر بوده و بنابراین قادر است از طریق ایجاد پیوند درون مولکولی با گروه کربوکسیل، احتمال پروتونه شدن این گروه اسـیدی را کـاهش دهـد. همچنین با اعمال اثر القایی بـر گـروه اسـید کربوکسـیل و کشـاندن دانسیته الکترونی پیوند اکسیژن- هیدروژن بـه سـمت اکسـیژن، بـار جزئی منفی در اکسیژن و بارجزئی مثبت در هیدروژن ایجاد کـرده و موجب افزایش قطبیت اسید جنتیسیک گردد (Perez-Gonzalez *et al.*, 2014). در حـالی کـه در اسـید آلفارزورسـیلیک هـر دو گـروه هیدروکسیل در موقعیت متای حلقه فنلی (دورتر از گروه کربوکسیل) قرار دارند و به دلیل فاصله بیشتر، اثـر کِشـندگی الکتـرون و القـایی کمتری نسبت به گروه اورتو بر روی گروه کربوکسیل اعمال می‌کند، بنابراین اسید آلفارزورسیلیک قطبیت پایینتر و ضریب توزیع بـالاتری نسبت به اسید جنتیسیک نشان می دهد.

با کاهش pH از 5/5 به 3/5 افزایش در مقدار ضریب توزیـع هـر دو ترکیب مشاهده گردید. علت این امر را می‌توان به افزایش غلظـت یون $[H]^+$ در محیط نسبت داد. با افزایش اسیدیته، غلظت یون $[H]^+$ در محیط افزایش یافته و به تبع آن احتمال پروتونه شدن گروه اسیدی کربوکسیل ترکیبات افزایش می‌یابد، با پروتونه شدن گروه اسیدی این ترکیبات میزان حلالیت آنها در فاز آبی کاهش یافته و Log P افزایش

می‌یابد.

جدول 2- ضریب توزیع (Log P) اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک

ترکیبات فنلی	ضریب توزیع (Log P) در pH	
	5/5	3/5
اسید جنتیسیک	-0/66 ± 4/04 [a]	0/37 ± 0/02 [b]
اسید آلفا-رزورسیلیک	-0/45 ± 0/02 [b]	0/49 ± 0/01 [a]

حروف مختلف در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 95% است

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

استفاده از رادیکال DPPH پایدار، روشی سریع، آسان و ارزان به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف است. با جذب مولی رادیکال DPPH در طول موج 517 نانومتر، الکترون ناپیوندی این رادیکال با یک اتم هیدروژن متعلق به آنتی‌اکسیدان واکنش می‌دهد و رنگ محلول برحسب شدت مهار رادیکال، از بنفش به زرد تغییر پیدا می‌کند.

جدول 3- فعالیت آنتی‌رادیکالی اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک در خنثی‌سازی رادیکال‌های DPPH

ترکیبات فنلی	IC50 (میکرو مولار)	فعالیت آنتی رادیکالی (RSA)
اسید جنتیسیک	37 ± 1/1 [b]	2/7 ± 0/04 [a]
اسید آلفا-رزورسیلیک	383 ± 2/9 [a]	0/26 ± 0/01 [b]

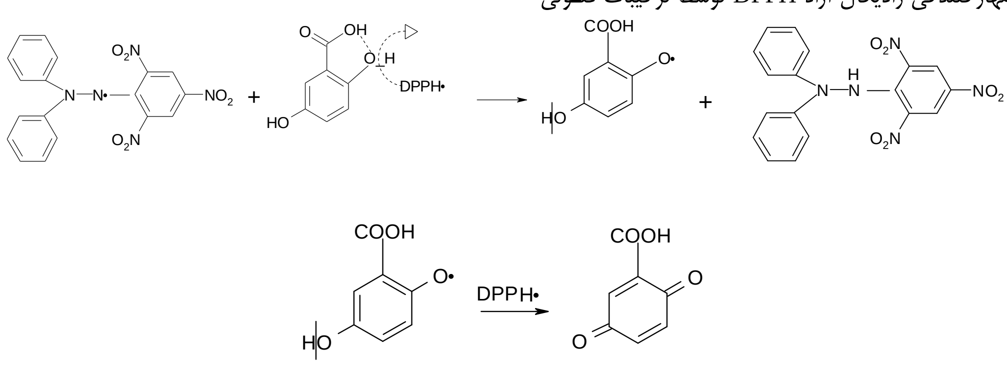
حروف مختلف در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 95% است

به‌طور عمده‌ای به تعداد و آرایش گروه‌های هیدروکسی در مولکول بستگی دارد. افزایش گروه‌های هیدروکسیلی در ترکیب، احتمال اهدا هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن افزایش مهار رادیکال‌های آزاد را در پی دارد (Sroka & Cisowski, 2003).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (RSA) ترکیبات مزبور براساس فاکتور IC50 (غلظتی از آنتی‌اکسیدان که 50 درصد رادیکال آزاد را مهار می‌کند) اندازه‌گیری و در جدول 3 نشان داده شد. همانگونه که مشخص است، میزان RSA ترکیب اسید جنتیسیک حدود 10 برابر اسید آلفارزورسیلیک اندازه‌گیری شده است. این نتایج نشان‌دهنده فعالیت بسیار بالاتر اسید جنتیسیک در مهار کردن رادیکالهای آزاد DPPH نسبت به اسید آلفارزورسیلیک می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این آزمون با یافته‌های Brand-Williams مطابقت داشت (Brand-Williams *et al.*, 1995).

در اسید جنتیسیک، گروه هیدروکسیل قرار گرفته در موقعیت اورتو حلقه فنلی، به دلیل نزدیکی به گروه اسید کربوکسیل ترکیب، تمایل به برقراری پیوند هیدروژنی درون مولکولی با این گروه اسیدی را دارا می باشد. با ایجاد این پیوند هیدروژنی درون مولکولی، پیوند اکسیژن- هیدروژن هیدروکسیل این موقعیت (اورتو) انرژی پیوند بسیار پایینی پیدا خواهد کرد که جدا شدن و انتقال هیدروژن از این موقعیت به رادیکال آزاد DPPH را راحتتر و سریعتر خواهد کرد. شکل رادیکالی اسید جنتیسیک بعد از جدا شدن هیدروژن‌ها نیز از طریق رزونانس، ساختار پایدار کوئینون را تشکیل می‌دهد که تمایلی برای شرکت در واکنش‌های رادیکالی به‌عنوان رادیکال آغازگر را ندارد (شکل4).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط ترکیبات فنولی

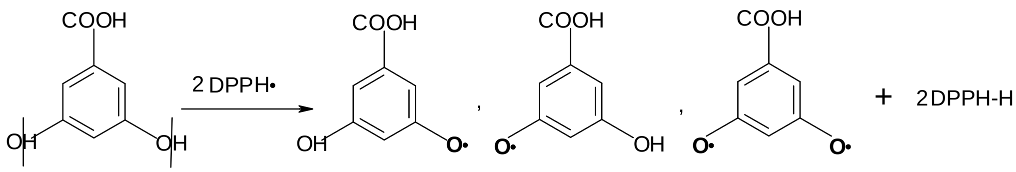


quinone

شکل 4- مکانیسم احتمالی به دام انداختن رادیکال‌های DPPH توسط اسید جنتیسیک و تشکیل کوئینون

در اسید آلفارزورسیلیک، به دلیل قرارگیری هر دو گروه هیدروکسیل در موقعیت متای حلقه فنلی، توانایی ایجاد پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و جدا شدن هیدروژن از این موقعیت‌ها کمتر خواهد بود. به همین دلیل فعالیت پایین‌تری در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH نسبت به اسید جنتیسیک از خود نشان داده است. همچنین مطابق شکل 5 اسید آلفارزورسیلیک از نظر ساختمانی،

پس از جدا شدن هیدروژن‌ها، توانایی تشکیل کوئینون به‌عنوان رادیکال پایدار را ندارد (Kawabata *et al.*, 2002).



شکل 5- مکانیسم احتمالی به دام انداختن رادیکال‌های DPPH توسط اسید آلفارزورسیلیک

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روغن‌های گیاهی

ساختار اسید چربی روغن‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در جدول 1 نشان داده شده است. شاخص اکسایش‌پذیری (COX Value) روغن سویا تقریبا 4 برابر روغن زیتون برآورد گردید.

ترکیب اسید چربی روغن‌ها نقش بسیار مهمی در پایداری اکسایشی آنها ایفا می‌کند. وجود اسیدهای چرب چندغیراشباعی در روغن سویا، موجب افزایش سرعت فرایند اکسایش این روغن نسبت به روغن زیتون گردید. در اسیدهای چرب چندغیراشباعی بالا بودن فعالیت گروههای متیلنی بین دو باند دوگانه، موجب پایینتر بودن انرژی پیوند کربن- هیدروژن در این اسیدها و به تبع آن حساسیت بالاتر نسبت به فرایند اکسایش و تشکیل رادیکال آزاد در مقایسه با اسیدهای تک‌غیراشباعی می‌گردد (Akoh, 2002)، به‌طوری که نسبت سرعت واکنش اولئات، لینولئات و لینولنات با اکسیژن به‌ترتیب 1، 12 و 25 گزارش شده است (Schaich *et al.*, 2013).

روند اکسایشی روغن‌های زیتون و سویا، بر اساس سرعت تولید هیدروپراکسید و طول مدت مرحله آغازین اکسایش در حضور و عدم حضور اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک در دمای 80 درجه سانتی‌گراد در جدول 4 نشان داده شده است. استفاده از اسید جنتیسیک در هر دو روغن زیتون و سویا، به‌ترتیب با فعالیت آنتی‌اکسیدانی 804/5 و 68/3 پایداری اکسایشی این روغن‌ها را به میزان چشمگیری افزایش داد. این در حالی است که اسید آلفارزورسیلیک در روغن زیتون و سویا به‌ترتیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی 2/4 و 1/7 نشان داد.

جدول 4- پارامترهای سینتیکی تشکیل پراکسید در طول دوره اکسایش روغن های گیاهی در دمای 80 درجه سانتی‌گراد

	آنتی اکسیدان	Winh	IPinh (ساعت)	فعالیت آنتی اکسیدانی (A)
روغن زیتون	شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان)	**0/543 ± 0/05 d**	**9/35 ± 0/12 bc**	**-**
	اسید جنتیسیک	0/0218 ± 0/01f	313/1 ± 1/96 a	804/5 ± 1/1a
	اسید آلفا-رزورسیلیک	0/28 ± 0/01e	12/07 ± 0/34 b	2/39 ± 2/02c
روغن سویا	شاهد (بدون آنتی اکسیدان)	15/38 ± 0/12 a	1/56 ± 0/08 c	-
	اسید جنتیسیک	1/82 ± 0/04 c	12/56 ± 0/42 b	68/03 ± 0/01b
	اسید آلفا-رزورسیلیک	11/05 ± 0/06 b	1/9 ± 0/1 c	1/70 ± 0/01c

حروف مختلف در هر ستون و در هر نوع روغن به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 95% است

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر اسید جنتیسیک در روغن‌ها، به تفاوت ساختمانی آن با اسید آلفارزورسیلیک مرتبط است. وجود یکی از گروههای هیدروکسیلی در موقعیت اورتو حلقه فنلی اسید جنتیسیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری به این ترکیب می‌بخشد. همانگونه که قبلا صحبت شد، پایینتر بودن آنتالپی تفکیک پیوند اکسیژن- هیدروژن گروه هیدروکسیلی در موقعیت اورتو نسبت به موقعیت متا موجب تسهیل جداسازی اتم هیدروژن و انتقال آن به رادیکالهای آزاد از جمله پراکسید (ROO•) می‌شود (Ali *et al.*, 2013).

رادیکال‌های پراکسید، عوامل اصلی انتشار فرایند زنجیره‌ای اکسایش هستند. این رادیکالهای ناپایدار، با جدا کردن هیدروژن را از اسیدهای چرب مجاور تشکیل هیدروپراکسید (ROOH) و رادیکال اسید چرب (R•) را داده و به همین منوال موجب گسترش فرایند اکسایش و تخریب روغن می‌شوند (ROO• + RH⟶ R• + ROOH).

اسید جنتیسیک با انتقال هیدروژن به رادیکال‌های پراکسید تشکیل شده، قادر به توقف چرخه رادیکالی اکسایش می‌باشد(ROO• + InH ⟶ ROOH + In•)، این ترکیب همچنین قادر است پس از جدا شدن اتم‌های هیدروژن‌اش، از طریق رزونانس به شکل پایدار کوئینون درآید که تمایلی برای شرکت در واکنش رادیکالی اکسایش

نداشته و بنابراین موجب قطع زنجیره‌ی اکسایش می‌شود (Shahidi & Zhong, 2015).

در مقایسه، اسید آلفارزورسیلیک به دلیل ساختار مولکولی که دارد (قرار گرفتن هر دو گروه هیدروکسیل در موقعیت متا) تمایل کمتری برای جدا شدن اتم‌های هیدروژن دارد. از طرفی رادیکال حاصله از جدا شدن اتم‌های هیدرژون این ترکیب، قادر به تشکیل کوئینون از طریق رزونانس نیست بنابراین ممکن است به‌عنوان یک رادیکال آغازگر در واکنش شرکت کند. به همین دلایل آلفارزورسیلیک اسید فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایینی در مقایسه با اسید جنتیسیک از خود نشان داد.

نتایج حاصله از این آزمون مشابه نتایج حاصله از آزمون DPPH بود با این تفاوت که در روش DPPH تحت تاثیر حلال متانولی استفاده شده، فعالیت آنتی رادیکالی پایینتری مشاهده گردید. ثابت دی‌الکتریک محیط متانولی در روش DPPH بسیار بالاتر از محیط لیپیدی است. ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی، بین گروه‌های هیدروکسیل حلال قطبی متانول و گروه‌های قطبی در آنتی‌اکسیدان‌ها، مانع جدا شدن راحت و سریع هیدروژن از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و انتقال آنها به رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Zhang *et al*., 2013).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در امولسیون‌های روغن در آب

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای جنتیسیک وآلفارزورسیلیک در امولسیون‌ها، بر اساس پارامترهای سینتیکی محاسبه شده در فرایند اکسایش، در جدول 5 نشان داده شده است. نتایج حاصله از این آزمون با نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌ها در روغن‌ها متفاوت بود.

در مقایسه با روغن‌ها، اسید جنتیسیک در امولسیون‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار پایینتری از خود نشان داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در امولسیون‌های روغن‌های زیتون و سویا در آب به‌ترتیب 11/33 و 6/75 اندازه‌گیری شد. این در حالی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این آنتی‌اکسیدان در روغن زیتون و سویا به‌ترتیب 804 و 68 برآورد شد.

جدول 5- پارامترهای سینتیکی مصرف اکسیژن در طول دروه اکسایش امولسیون‌های روغن در آب (دمای 37 درجه سانتی‌گراد)

	آنتی اکسیدان	W_{inh}	IP_{inh}(ساعت)	فعالیت آنتی اکسیدانی (A)
روغن زیتون	شاهد (بدون آنتی اکسیدان)	**-110/02 ± 1/17** [c]	**0/9 ± 0/01** [c]	-
	اسید جنتیسیک	-32/8 ± 0/21 [a]	3/4 ± 0/03 [a]	11/33 ± 0/19 [a]
	اسید آلفا-رزورسیلیک	-52/94 ± 0/83 [b]	1/88 ± 0/01 [b]	4/3 ± 0/23 [c]
روغن سویا	شاهد (بدون آنتی اکسیدان)	-332/1 ± 2/04 [f]	0/3 ± 0/01 [f]	-
	اسید جنتیسیک	-128 ± 0/76 [d]	0/78 ± 0/02 [d]	6/75 ± 0/31 [b]
	اسید آلفا-رزورسیلیک	-199/4 ± 0/94 [e]	0/5 ± 0/01 [e]	2/77 ± 0/42 [d]

حروف مختلف در هر ستونو در هر نوع روغن به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 95% است

این نتایج را می‌توان توسط فرضیه تناقض قطبی[2] توضیح داد، طبق این تئوری، آنتی‌اکسیدان‌های آب‌گریزتر به‌طور موثرتری در فصل مشترک آب- روغن امولسیون‌ها قرار می‌گیرند و با ممانعت از تاثیر رادیکال‌های تولید شده در فاز آبی بر تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری از خود نشان می‌دهند و برعکس، آنتی‌اکسیدان‌های آبدوست‌تر تمایل بیشتری برای ماندن در فاز آبی امولسیون داشته و بنابراین قادر به محافظت از فاز لیپیدی امولسیون در سطح مشترک آب- روغن نیستند. در حقیقت فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیبات در سیستم‌های امولسیونی علاوه بر پتانسیل آنتی‌رادیکالی این ترکیبات، به میزان توزیعشان در سطح مشترک آب-روغن یعنی مکانی که اکسایش رخ می‌دهد نیز بستگی دارد (Zhong & Shahidi, 2012).

با توجه به نتایج حاصل از آزمون اندازه‌گیری ضریب توزیع ترکیبات (Log P)، اسید جنتیسیک حلالیت بالاتری در فاز آبی امولسیون نسبت به فاز روغنی دارد، بنابراین کمتر می‌تواند خود را به سطح مشترک روغن و آب رسانده و مانع از اکسایش روغن گردد. اگرچه اسید جنتیسیک به دلیل ساختمان مولکولی‌اش (قرارگیری یک گروه هیدروکسیل در موقعیت اورتو) همچنان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به اسید آلفارزورسیلیک در هر دو امولسیون از خود نشان داده، اما ساختمان آبگریز اسید آلفارزورسیلیک باعث شده این ترکیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری در امولسیون‌ها نسبت به روغن‌ها از خود نشان دهد.

اسید آلفارزورسیلیک با ضریب توزیع 0/24- در pH 5/5، حلالیت کمتری در فاز آبی امولسیون دارد بنابراین قادر است در سطح مشترک روغن-آب تجمع کند و از واکنش فاز روغنی امولسیون با

[2] Polar Paradox Theory

رادیکال‌های تولید شده در فاز آبی امولسیون جلوگیری کند. این در حالی که در روغنها (Bulk oils)، اسید آلفارزورسیلیک در کل روغن پخش شده و قادر نخواهد بود با تجمع در سطح روغن-هوا از روغن در برابر اکسایش محافظت کند.

نتیجه‌گیری

تاثیر ساختمان مولکولی ترکیبات بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک در محیط‌های متفاوت در این پژوهش، مورد بررسی قرار داده شد. موقعیت قرارگیری گروه‌های کِشنده الکترون در حلقه فنلی آنتی‌اکسیدان‌ها، پیوندهای هیدوژنی درون‌مولکولی و بین‌مولکولی این ترکیبات تحت تاثیر محیط مورد استفاده تاثیر بسزایی در میزان فعالیت آنتی‌رادیکالی ترکیبات مورد آزمون داشت.

اسید جنتیسیک در سه محیط آزمون متانولی، روغن‌ها و امولسیون‌ها فعالیت آنتی‌رادیکالی بسیار بالاتری نسبت به اسید آلفارزورسیلیک نشان داد. قرارگیری گروه عاملی هیدروکسیل در موقعیت اورتو حلقه فنلی اسید جنتیسیک، عامل افزایش ایجاد پیوندهای هیدروژنی درون‌مولکولی و به تبع آن سهولت انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر این ترکیب نسبت به اسید آلفارزورسیلیک اسید با ساختار متا تشخیص داده شد.

از سوی دیگر این آرایش ساختمانی، خاصیت آبدوستتری به اسید جنتیسیک بخشیده که موجب شد در محیط آبگریز روغن، بیشتر در سطح مشترک هوا- روغن (مکانی که اکسایش در روغن رخ می‌دهد) قرارگرفته و مطابق فرضیه تناقض قطبی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری در روغن نسبت به سیستم امولسیون نشان دهد، در حالی که اسید آلفارزورسیلیک به دلیل ساختار آب گریزترش در محیط امولسیون (سطح مشترک آب روغن) فعالیت بهتری نشان داد.

میزان فعالیت آنتی‌رادیکالی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد آزمون به میزان چشمگیری تحت تاثیر محیط آزمایش قرار داشت. اسیدهای جنتیسیک و آلفارزورسیلیک در محیط روغنی نسبت به محیط متانولی فعالیت آنتی‌رادیکالی بسیار بالاتری نشان دادند. متانول استفاده شده در روش DPPH، با قابلیت برقراری پیوندهای هیدروژنی بین‌مولکولی، موجب کاهش جدا شدن هیدروژن از ترکیبات و در نتیجه کاهش فعالیت آنتی‌رادیکالی آنها گردید، این در حالی بود که در روغن زیتون و سویا، شرایط پایین بودن ثابت دی‌الکتریک و شرایط بدون آب روغن‌ها، موجب افزایش پیوندهای هیدروژنی درون‌مولکولی ترکیبات و در نتیجه افزایش جدا شدن هیدروژن از آنها و انتقال به رادیکال‌های آزاد شد. البته میزان غیراشباعیت و ترکیب اسید چربی روغن‌ها هم تاثیر بسزایی در پایداری اکسایشی آنها تحت تاثیر آنتی‌اکسیدانها داشت. روغن سویا با داشتن ساختار غیراشباع‌تر در مقایسه با روغن زیتون پایداری اکسایشی کمتری نشان داده و کارایی آنتی‌اکسیدان‌ها در آن کمتر از روغن زیتون بود.

منابع

Akoh, C. C., Min, D. B., 2002, Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. Marcel Dekker, New York, pp 432-427.

Ali, HM. Abo-Shady, A., Sharaf Eldeen, HA. Soror, HA. Shousha, WG. Abdel-Barry, OA. & Saleh, AM., 2013, Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds. *Chem Cent J*, 7(1), 53.

Ashidate, K., Kawamura, M., Mimura, D., Tohda, H., Miyazaki, S., Teramoto, T., Yamamoto, Y., & Hirata, Y., 2005, Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *Eur J Pharmacol*, 513(3), 173-179.

Billaud, C., Lecornu, D. & Nicolas, J., 1996, Substrates and Carboxylic Acid Inhibitors of a Partially Purified Polyphenol Oxidase from Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1668-1675.

Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A. & Sroka, Z., 2013, Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 67, 958-963.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Cheng, Z., Ren ,J., Li, Y., Chang, W. & Chen, Z., 2003, Establishment of a quantitative structure-activity relationship model for evaluating and predicting the protective potentials of phenolic antioxidants on lipid peroxidation. *J Pharm Sci*, 92(3), 475-484.

Farhoosh ,R. & Hoseini-Yazdi, S. Z., 2013. Shelf-life prediction of olive oils using empirical models developed at low and high temperatures. *Food Chemistry*, 141(1), 557-565.

Farhoosh, R., Johnny, S., Asnaashari, M., Molaahmadibahraseman, N. & Sharif, A., 2016, Structure-antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chem*, 194, 128-134.

Gordon, M. H., Paiva-Martins, F. & Almeida, M., 2001, Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem*, 49(5), 2480-2485.

Griffiths, L. A., 1959, On the Distribution of Gentisic Acid in Green Plants. *Journal of Experimental Botany*, 10(3), 437-442.

Herrmann, K., 1989, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 28(4), 315-347.

Kawabata, J., Okamot, Y., Kodama, A., Makimoto, T. & Kasai, T., 2002, Oxidative dimers produced from protocatechuic and gallic esters in the DPPH radical scavenging reaction. *J Agric Food Chem*, 50(19), 5468-5471.

Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C., 2006, Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79(21), 2056-2068.

Lingnert, H., Vallentin, K. & Eriksson, C. E., 1979, Measurement of antioxidative effect in model system. *Journal of Food Processing and Preservation*, 3(2), 87-103.

Marinova, E. M. & Yanishlieva, N. V., 2003, Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, 81(2), 189-197.

Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. & Theoharides, T. C., 2000, the effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52(4), 673-751.

Perez-Gonzalez, A., Galano, A. & Alvarez-Idaboy, J. R., 2014, Dihydroxybenzoic acids as free radical scavengers: mechanisms, kinetics, and trends in activity. *New Journal of Chemistry*, 38(6), 2639-2652.

Réblová, Z., 2012, Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech J Food Sci*, 30(2), 171-177.

Sakas ,M. B., Pericin, D. M., Mandic, A. I. & Kormanjos, s. M., 2004, Antioxidant properties of ethanolic extract of sugar beet pulp. *Acta Periodica Technologica*, 35, 1–280.

Schaich, K. M., Shahidi, F., Zhong, Y. & Eskin, N. A. M., 2013, Chapter 11- Lipid Oxidation In Biochemistry of Foods (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp 419-478.

Schwarz, K., Huang, S. W., German, J. B., Tiersch, B., Hartmann, J. & Frankel, E. N., 2000, Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of Oil-in-Water and Water-in-Oil emulsions and bulk Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4874-4882.

Shahidi, F. & Wanasundara, P. K., 1992, Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32(1), 67-103.

Shahidi, F. & Naczk, M., 2003, Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C.

Shahidi, F. & Zhong, Y., 2015, Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, Part B, 757-781.

Shantha, N. C. & Decker, E. A., 1994, Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int*, 77(2), 421-424.

Sroka, Z. & Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753-758.

Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J., 2002, Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13-25.

Yanishlieva, N. & Marinova, E .M., 1995, Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, 54(4), 377-382.

Yoshida, H., Kondo, I. & Kajimoto, G., 1992, Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(11), 1136-1140.

Zhang, J., Wang, S., Guo, Y., Xu, D., Li, X. & Tang, X., 2013, Co-Oxidation Effects of Methanol on Acetic Acid and Phenol in Supercritical Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(31), 10609-10618.

Zhong, Y. & Shahidi, F., 2012, Antioxidant Behavior in Bulk Oil: Limitations of Polar Paradox Theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 4-6

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 5, Dec- Jan 2019, p. 743-753

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 5، آذر - دی 1397، ص. 753-743

Antioxidant Activity of Gentisic and Alpha-resorcylic Acids in Bulk Oils and Emulsions

A. Mardani[1], R. Frhoosh[2*], A. Sharif[3]

Received: 2017.07.18
Accepted: 2018.07.07

Introduction: Hydroxybenzoic acids are a large family of phenolic acids capable of inhibiting one of the most destructive reactions called lipid oxidation. Their antioxidant activities are markedly influenced by the number and position of phenolic OH groups. Increasing the number of electron-donating groups in the molecule and their placement at the *ortho* and/or *para* positions of the phenolic ring, could lead to the increased ability of H atom abstraction or electron donating capacity. Gentisic (3,5-dihydroxybenzoic acid**)** and Alpha-resoecylic (2,5-dihydroxybenzoic acid) acids are dihydroxybenzoic acids wildly dispersed in the plant tissues with some valuable biological and pharmacological properties for human health. These compounds are different in structure and position of hydroxyl groups in phenolic ring, that may had a strong influence on their antioxidant properties. In addition of structural property, environmental interference can play an important role in the antioxidant potency. Antioxidants are found to behave differently when used in different media.

Materials and methods: Partition coefficient (log P) of Gentisic acid and Alpha-resorcylic acid was measured between 1-octanol and acetate buffers. Antiradical and antioxidant activity of compounds was investigated in different medium (solvent system, purified bulk olive and soybean oils and their O/W emulsions). DPPH radical scavenging activity of gentisic acid and alpha-resorcylic acid was measured in the methanolic solvent. Progress of lipid oxidation in olive oil and soybean oil containing 200 ppm of the antioxidants at 80 ^{o}C was followed by monitoring the changes in peroxide value (PV). PV was measured spectrophotometrically at 500 nm using a UV– Vis instrument. Oxygen depletion in emulsion systems in the absence and present of the antioxidant (200 ppm) was measured using a YSI Model 5300A biological oxygen monitor at 37^{o}C. The effectiveness of the antioxidants in bulk oils and emulsions was estimated on the basis of the induction period (IP).

Results and discussion: The obtained results indicated that the effectiveness of the Gentisic and α-resorcylic acids in free radicals scavenging, was greatly affected by molecular structure of these antioxidants and environmental conditions.

Ortho position of hydroxyl group with respect to the carboxyl group in Gentisic acid, caused higher antiradical potency of Gentisic acid than α-resorcylic acid, with meta-structure, in different used mediums.

In addition, it was found that the environment plays an important role in the free radical scavenging activity of phenolic compounds. Gentisic acid with more hydrophilic structure showed better antioxidant activity in bulk oil hydrophobic systems, than emulsion systems, while α-resorcylic acid with less hydrophilic structure showed better activity in O/W emulsions. Both antioxidants showed low antioxidant performance in solvent system. The polar medium of the methanol used in DPPH assay, with enhanced intermolecular hydrogen bonds, decreased the radical scavenging potency of antioxidants.

Keywords: Gentisic acid, Alpha-resorcylic acid, vegetable oils, O/W emulsions

1, 2 and 3. PhD student, Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(Corresponding author: rfarhoosh@um.ac.ir)